#### WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Būro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7:

C09B 11/02, 11/26, G01N 33/533, 33/58, C07H 21/00

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/64987

A1 (43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

2. November 2000 (02.11.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP00/03569

(22) Internationales Anmeldedatum:

19. April 2000 (19.04.00)

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

199 19 120.4

27. April 1999 (27.04.99)

DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: DREXHAGE, Karl-Heinz [DE/DE]; Schanzenweg 50, D-57076 Siegen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ARDEN-JACOB, Jutta [DE/DE]; Am Hügel 25, D-90513 Zimdorf (DE). KEM-NITZER, Norbert [DE/DE]; Kronprinzenstrasse 106, D-57250 Netphen (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.: Kopemikusstrasse 9, D-81679 München (DE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen

(54) Title: NOVEL AMIDOPYRYLIUM FLUORESCENCE DYES

(54) Bezeichnung: NEUE AMIDOPYRYLIUM-FLUORESZENZ-FARBSTOFFE

(57) Abstract

The invention relates to the use of amidopyrylum compounds as marker groups in methods for detecting analytes. It further relates to novel amidopyrylium compounds.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Amidopyrylium-Verbindungen als Markierungsgruppen in Verfahren zum Nachweis von Analyten sowie neue Amidopyrylium-Verbindungen.

#### ${\it LEDIGLICH~ZUR~INFORMATION}$

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Мопасо	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	ΙE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JР	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
СМ	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		*
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	u	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dānemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 00/64987 PCT/EP00/03569

#### Neue Amidopyrylium-Fluoreszenz-Farbstoffe

10

30

#### Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Amidopyrylium-Verbindungen als Markierungsgruppen in Verfahren zum Nachweis von Analyten sowie neue Amidopyrylium-Verbindungen.

Xanthene zählen zu den lange bekannten und gut erforschten Fluoreszenzfarbstoffen. Ein verwandter Farbstoff mit abgewandeltem Grundgerüst, das 3,10-Bis-(dimethylamino)-5-methyl-6-oxo-6H[1]-benzopyrano[3,2-c]chinoliniumkation, wurde von H. Harnisch, Liebigs Ann. Chem. 751, 155-158 (1971), beschrieben.

15 Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Pyranen wurden derartige Verbindungen von K.H. Drexhage, Structure and Properties of Laser Dyes, in: F.P. Schäfer, Topics in Applied Physics, Vol. I, Dye Lasers, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973, auch als Amidopyrylium-Verbindungen bezeichnet. In dieser Veröffentlichung werden weitere als Farbstoff 140 und 141 bezeichnete Amidopyrylium-Verbindungen beschrieben. Ein Hinweis auf die Verwendung von Amidopyrylium-Verbindungen als Fluoreszenz-Markierungsgruppen in der Analytik findet sich nicht in der Literatur.

Bisher in der chemischen, medizinischen und biologischen Analytik verwendete Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren meist im Bereich < 600 nm. Daraus ergeben sich bei einer Verwendung als Markierungsgruppe, insbesondere bei biologischen Systemen, gravierende Nachteile: Für diagnostische Systeme ist es zweckmäßig, preisgünstige Lichtquellen wie z.B. Laserdioden (635 bzw. 680 nm) oder Helium-Neon-Laser (633 nm) einsetzen zu können. Um eine wirksame Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffs zu gewährleisten, sollte sein Absorptionsmaximum möglichst in der Nähe der Emissionswellenlänge der verwendeten

WO 00/64987

Lichtquelle liegen. Dies ist jedoch bei den bekannten Farbstoffen oftmals nicht gegeben. Ferner überschneiden sich in vielen Fällen die Absorptionsspektren der bekannten Farbstoffe mit der Absorption fluoreszierender Substanzen aus biologischen Systemen. Es ist daher wünschenswert, Fluoreszenzfarbstoffe ohne die genannten Nachteile für einen zuverlässigen und genauen Nachweis eines Analyten in einem biologischen System bereitzustellen.

Zur Verwendung als Markierungsgruppe in Nachweisverfahren für Analyten ist neben einer einfachen und zuverlässigen Nachweisbarkeit eine gute Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln, insbesondere in wässrigen Systemen, notwendig Weiterhin sollten derartige Verbindungen einfach und kostengünstig herzustellen sein und eine gute Haltbarkeit, d.h. Lagerfähigkeit, aufweisen.

15

20

. 10

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand somit darin, geeignete Fluoreszenzfarbstoffe zur Verwendung als Markierungsgruppe für Verfahren die insbesondere Nachweis von Analyten bereitzustellen, zum Absorptionsmaxima aufweisen, die den Einsatz von kostengünstigen des Absorptionsbereichs von in außerhalb Lichtquellen erlauben, biologischen Proben enthaltenen Stoffen absorbieren, gute Löslichkeit zeigen oder/und sich durch eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute auszeichnen, um die Nachteile des Standes der Technik zumindest teilweise zu vermeiden.

25

Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I

3

Cyc 
$$R_5$$
  $R_3$   $R_4$   $R_6$   $R_7$   $R_1$   $R_2$   $R_7$   $R_1$   $R_2$ 

als Markierungsgruppen in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten, wobei

Y Sauerstoff oder N-R<sub>8</sub> bedeutet,

10

20

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>8</sub> bei jedem Vorkommen unabhängig Wasserstoff, eine Phenyl-, eine Phenylalkylgruppe mit 1-3 C-Atomen in der Alkylkette, eine Polyether- oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 C-Atomen, vorzugsweise mit bis zu 6 C-Atomen, bedeuten, die gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Sulfo-, Carboxy-, Carbonyl-, Alkoxy- oder/und Hydroxy-, Amino-, Alkoxycarbonylgruppen, enthalten kann, oder einer oder mehrere der Reste R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>8</sub> mit einem benachbarten Substituenten ein Ringsystem bilden, R., R5. R6 und R7 jeweils unabhängig Wasserstoff, Halogen, Phenyl, oder oder Carboxygruppe Sulfoeine Hydroxy-, Amino-, Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 15 C-Atomen bedeuten, wobei die Kohlenwasserstoffgruppen Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Cycloalkyl-, Aryloder/und Heteroarylreste umfassen und gegebenenfalls jeweils einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, oder/und Alkoxy-Carboxy-, Aldehyd-, Amino-, Sulfo-, Alkoxycarbonylgruppen, enthalten können,

wobei einer oder mehrere der Reste  $R_4$ ,  $R_6$  und  $R_7$  mit einem benachbarten Substituenten ein Ringsystem bilden können,

Cyc einen organischen Rest bedeutet, der ein Ringsystem ausgewählt aus aromatischen, heteroaromatischen, chinoiden oder/und cycloaliphatischen Ringen umfaßt, das gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen,

WO 00/64987

Amino-, Hydroxy-, Sulfo-, Carboxy-, Aldehyd-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten kann, und

X gegebenenfalls zum Ladungsausgleich vorhandene Anionen bedeutet.

5

Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können als Markierungsgruppen in Verfahren zur qualitativen oder/und quantitativen Bestimmung eines Analyten verwendet werden. Die Bestimmung kann in wässrigen Flüssigkeiten, z.B. Proben von Körperflüssigkeiten wie etwa Blut, Serum, Plasma oder Urin, Abwasserproben oder Lebensmitteln, durchgeführt werden. Das Verfahren kann sowohl als Naßtest, z.B. in einer Küvette, oder als Trockentest auf einem entsprechenden Reagenzträger durchgeführt werden. Die Bestimmung der Analyten kann dabei über eine einzige Reaktion oder durch eine Sequenz von Reaktionen erfolgen.

15

10

Überraschenderweise zeigte die Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I sehr gute Ergebnisse in chemischen und insbesondere in medizinischen und biologischen Nachweisverfahren zur Bestimmung eines Analyten.

20

Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können in allen bekannten chemischen, medizinischen und biologischen Nachweisverfahren, in denen Fluoreszenzfarbstoffe als Markierungsgruppe geeignet sind, verwendet werden. Derartige Verfahren sind dem Fachmann bekannt und müssen deshalb nicht weiter ausgeführt werden.

25

30

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Verbindung der allgemeinen Formel I kovalent an einen für den nachzuweisenden Analyten spezifischen Rezeptor gekoppelt. Der spezifische Rezeptor ist jede geeignete Verbindung oder jedes geeignete Molekül, vorzugsweise ist es ein Peptid, Polypeptid oder eine Nukleinsäure. Die Verbindungen I oder Konjugate dieser Verbindung können beispielsweise in Nukleinsäure-

Hybridisierungsverfahren oder immunchemischen Verfahren verwendet werden. Derartige Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, neue Amidopyrylium-Verbindungen bereitzustellen, die insbesondere zur Verwendung als Markierungsgruppe in Nachweisverfahren von Analyten geeignet sind und die Nachteile des Standes der Technik zumindest teilweise vermeiden.

10

Diese Aufgabe wurde gelöst durch eine Verbindung der allgemeinen Formel I

Cyc 
$$R_5$$
  $R_3$   $R_4$   $R_6$   $R_7$   $R_1$   $X^-$ 

wobei

Y, R<sub>1</sub>-R<sub>7</sub> und Cyc die in Anspruch 1 angegebenen Bedeutungen besitzen,
X gegebenenfalls zum Ladungsausgleich vorhandene Anionen bedeutet,
mit der Maßgabe, daß wenn Y Sauerstoff, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> und R<sub>3</sub> Methyl und R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>,
R<sub>6</sub> und R<sub>7</sub> Wasserstoff sind,

Cyc keine Struktur der Formeln II oder III -

aufweist.

10

15

20

25

Ein Vorteil der Verbindungen I ist, daß durch eine fast beliebige Substituentenvariation die Eigenschaften einzelner Verbindungen, z.B. die spektroskopischen Eigenschaften, die Lage der Absorptionsmaxima, die Löslichkeitseigenschaften, die Fluoreszenzabklingzeit und die Höhe der Quantenausbeute, stark variiert und somit wie gewünscht ausgewählt werden können. Auf diese Weise können Interferenzen mit Störsubstanzen in Proben, wie etwa Serum, Blut oder Plasma etc., vermindert oder sogar ganz vermieden werden. Die Herstellung der Verbindungen I kann nach an sich bekannten Methoden auf einfache und kostengünstige Weise erfolgen, wie in den nachfolgenden Beispielen erläutert wird. Ferner sind die Verbindungen unproblematisch handhabbar. Ein weiterer Vorteil der Verbindungen I ist die große Stokes-Verschiebung der Fluoreszenz, wodurch eine gute Abtrennung der Anregungsstrahlung ermöglicht wird. Weiterhin zeichnen sich die Verbindungen durch eine hohe Stabilität aus, was sich insbesondere positiv auf ihre Lagerfähigkeit auswirkt.

Bevorzugt bedeutet Y Sauerstoff oder/und R<sub>5</sub> umfaßt ein aromatisches, gegebenenfalls substituiertes Ringsystem.

Die Verbindungen weisen vorzugsweise eine zur kovalenten Kopplung fähige Gruppe auf, z.B. -COOH, -NH<sub>2</sub>, -OH oder/und -SH. Über diese Kopplungsgruppe kann die Verbindung nach bekannten Methoden an einen Träger oder/und an ein Biomolekül gekoppelt werden. Als Träger kann jedes geeignete Material ausgewählt werden, z.B. poröses Glas, Kunststoffe, lonenaustauscherharze, Dextrane, Cellulose, Cellulosederivate oder/und

hydrophile Polymere. Die Biomoleküle werden vorzugsweise ausgewählt aus Peptiden, Polypeptiden, Nukleotiden, Nukleosiden, Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga oder/und Haptenen.

- 5 Überraschenderweise werden das Absorptionsmaximum und die Fluoreszenzquantenausbeute durch eine Kopplung der erfindungsgemäßen Verbindungen an die oben genannten Träger und Biomoleküle nicht wesentlich verändert.
- In einer bevorzugten Verbindungsklasse sind R<sub>1</sub> mit R<sub>7</sub> oder/und R<sub>2</sub> mit R<sub>4</sub> verbrückt und bilden eine Ringsystem, insbesondere mit 5- oder 6-gliedrigen Ringen. In einer besonders bevorzugten Verbindungsklasse weist Cyc in Formel I eine Struktur der Formeln IV, V oder VI

$$R_{10}$$
 $R_{2}$ 
 $R_{10}$ 
 $R_{10}$ 
 $R_{11}$ 
 $R_{11}$ 

auf, wobei  $R_1$ ',  $R_2$ ' und  $R_3$ ' wie  $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$  oben definiert sind und  $R_9$ - $R_{11}$  wie  $R_4$ - $R_7$  oben definiert sind.

In einer weiteren bevorzugten Verbindungsklasse sind  $R_1$ ' mit  $R_{11}$  oder/und  $R_2$ ' mit  $R_{10}$  verbrückt und bilden ein Ringsystem, insbesondere einen 5- oder 6-gliedrigen Ring.

Beispiele für besonders bevorzugte Verbindungsklassen sind in den allgemeinen Formeln VIIa bis f dargestellt:

VIIa
$$R_{2} \stackrel{R}{\longrightarrow} R_{1} \stackrel{R}{\longrightarrow} R_{1} \qquad X^{-}$$

$$R_{R} \stackrel{R}{\longrightarrow} R_{R} \qquad X^{-}$$

WO 00/64987 PCT/EP00/03569

9

VIIe 
$$R$$

5

wobei

WO 00/64987

die gestrichelten Linien gegebenenfalls Doppelbindungen bedeuten, bei deren Vorhandensein die über eine gestrichelte Linie gebundenen Reste R fehlen,

X, Y,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$  wie oben definiert sind und R jeweils unabhängig wie  $R_4$  oben definiert ist.

Konkrete Beispiele für erfindungsgemäße Verbindungen sind in der folgenden Tabelle 1 dargestellt.

# <u>Tabelle 1</u> Erfindungsgemäße Amidopyrylium-Verbindungen Spektrale Daten in Ethanol:

λ<sub>A</sub>: Absorptionsmaximum

Fluoreszenzmaximum λ<sub>F</sub>:

Fluoreszenzquantenausbeute Q<sub>F</sub>:

	Struktur	λ <sub>A</sub> / nm	λ <sub>F</sub> / nm	Q <sub>F</sub> / %
NK 9	H <sub>3</sub> C CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	595	650	21
2 NK 1	H <sub>3</sub> C N CH <sub>3</sub> + C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	609	668	11
3 NK 8	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	595	650	34
4 NK 5	O CH <sub>3</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	609	663	19
5 JA 227	CO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	596	651	31

	i	602	646	17
6 Farbstoff 141	N CH3	602	646	47
	+ CH <sub>3</sub>			
7 JA 230	O CH <sub>3</sub> + C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	613	665	31
8 JA 226	O CH <sub>3</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	613	664	37
9 JA 228	O CH <sub>3</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	628	675	24
10 NK 6	H <sub>3</sub> C	628	680	21
11 NK 4	O CH <sub>3</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	522	605	21

		587	650	15
12 NK 7	-0 CH <sub>3</sub>			
13 Farbstoff 140	H <sub>3</sub> C N CH <sub>3</sub>	664	715	2
14 NK 2	H <sub>3</sub> C <sub>2</sub> N CH <sub>3</sub> H <sub>5</sub> C <sub>2</sub> N CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	666	720	1
15 JA 210	H <sub>3</sub> C N CH <sub>3</sub> + C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	682	725	4
16 NK 13	H <sub>5</sub> C <sub>2</sub> O <sub>2</sub> C O CH <sub>3</sub> H <sub>5</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	593	650	23
17 NK 13 A	H <sub>5</sub> C <sub>2</sub> N CH <sub>3</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	588	645	26

18 NK 14	H <sub>5</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	603	665	14
19 NK 15	HO <sub>2</sub> C O CH <sub>3</sub>	597	642	51
20 NK 16	HC <sub>2</sub> C O CH <sub>3</sub> + C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	608	660	30
21 NK 19	HC <sub>2</sub> C O CH <sub>3</sub> H, <sub>3</sub> C CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	573	635	17
22 NK 20	HO <sub>2</sub> C CH <sub>3</sub> H <sub>3</sub> C C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	589	665	9

- 00	1	608	655	44
23 NK 21	H <sub>3</sub> C			
· 24 NK 22	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H CH <sub>3</sub>	622	675	25
25 NK 10 <sup>-</sup>	CH <sub>3</sub> CI CO <sub>2</sub> H CO <sub>2</sub> H CH <sub>3</sub>	640	695	15
26 NK 26	CI CH <sub>3</sub> CI CO <sub>2</sub> H CO <sub>2</sub> H	661	716	10
27 NK 17	$\begin{array}{c} CI \\ CI \\ CI \\ CI \\ CO_2H \\ CO_2H \\ CO_2H_5 \\ CH_3 \\ CH_4 \\ CH_5 $	617	672	20

28 NK 18	CI CI CO <sub>2</sub> H CO <sub></sub>	631	686	15
29 NK 27	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H CO <sub>2</sub> H CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> COOH	623	678	25
30 NK 28	H <sub>3</sub> C C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	635	690	30
31 NK 29	H <sub>3</sub> C CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	622	677	21
32 NK 30	H <sub>3</sub> C <sub>2</sub> N CH <sub>3</sub> CH	718	770	2

33	1	622	675	35
NK 31	CO <sub>2</sub> H O CH <sub>3</sub> N C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>			
34 NK 33	H <sub>3</sub> C	611	666	25
35 NK 35	F F CO <sub>2</sub> H O CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>5</sub>	631	686	13
36 NK 36	F F F F C C C C C C C C C C C C C C C C	635	690	15
37 NK 37	F F F F F F F F F F F F F F F F F F F	677	733	14

		673	725	11
38	F, F	0/3	725	11
NK 38				
	CH <sub>3</sub> F CO <sub>2</sub> H			
	O CH <sub>1</sub>			
	H <sub>3</sub> C			
1	Hichin			
	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>			
	H <sub>3</sub> C CH <sub>3</sub>			
		629	684	30
39	CI	029	004	30
NK 24	CH³ CI CO³H			
	CH <sub>3</sub> Cl CO <sub>2</sub> H O CH <sub>3</sub>			
	H <sub>3</sub> C			
	H <sup>1</sup> C N			
	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>			
	. CH3			
40	CI	643	698	35
NK 25				
	CH <sub>3</sub> Cl CO <sub>2</sub> H			
	HiC			
	H,C N C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> + C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>			
	$\sim$	610	664	18
41	0	010	004	10
NK 39	N CH(CH3):			
	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> + C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>			
	City Notice			
42	O (CH-);—SO:H	610	663	20
NK 40	N (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> —SO <sub>3</sub> H			
				:
	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>			
	C2(1)			
43	0	609, s	663	18
NK 41	N CH <sub>3</sub>			
	N			
	(ÇH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>			
	NH <sub>3</sub> -			
	, m	<u></u>	<u> </u>	L

5

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert. Die Abbildungen 1, 2 und 3 zeigen die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der erfindungsgemäßen Verbindungen JA 227 (5), NK 13 (16) bzw. NK 14 (18).

#### Beispiele

#### Herstellung der Amidopyrylium-Verbindungen

#### 5 A. Farbstoffe mit R<sub>5</sub> = H

Die Synthese der Vorprodukte erfolgt analog zur Synthesevorschrift von Harnisch und Brack (Liebigs Ann. Chem. 740 (1970), 164 - 168). Die Farbstoffsynthesen werden bei einer auf 100 °C verringerten Reaktionstemperatur durchgeführt. Sie werden exemplarisch anhand der Strukturen 5 (JA 227) und 15 (JA 210) beschrieben. Die Darstellung der Edukte ist im nachfolgenden Beispiel enthalten oder literaturbekannt.

#### Verbindung JA 210

1. Stufe:

10

15

30

- 9-Ethyl-4-hydroxy-6,7,8,9-tetrahydro-1H-pyrido[2,3-g]chinol-2-on
- 3,5 g 7-Amino-1-ethyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin und 3,7 g Malonsäurediethylester werden auf 180 190°C erhitzt. Über eine Kolonne (Länge: 10 cm; Durchmesser: 0,5 cm) wird solange Ethanol abdestilliert, bis sich im Kolben ein Feststoff gebildet hat. Der Feststoff wird in 30 ml Aceton verrührt, abgesaugt und der Niederschlag mit Methanol gewaschen. Der Niederschlag wird über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 20 g

<sup>1</sup>H-NMR-Daten in CDCl<sub>3</sub>:

δ 1,1 (T, 3H, -CH<sub>3</sub>); 1,8 (M, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 2,7 (T, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-); 3,2 - 3,4 (M, 4H, 2 x N-CH<sub>2</sub>-); 5,4 (S, 1H, -=CH-); 6,4 (S, 1H, ArH); 7,3 (S, 1H, ArH); 10,5 (S, 1H, -NH); 10,6 (S, 1H, -OH)

21

2. Stufe:

5

15

9-Ethyl-4-methoxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on

2 g (8,2 mmol) 9-Ethyl-4-hydroxy-6,7,8,9-tetrahydro-1H-pyrido[2,3-g]chinol-2-on werden in 25 ml Dimethylformamid suspendiert und mit 6,7 g (0,12 mol) Kaliumhydroxid versetzt. Dazu tropft man bei max. 60 °C 8,6 g (0,07 mol) Dimethylsulfat (Kühlung mit Eis/Kochsalzbad). Die Suspension wird in 200 ml Wasser ausgetragen. Es bildet sich ein gut filtrierbarer Niederschlag, der abgesaugt und getrocknet wird.

10 Ausbeute: 1.8 g

Smp.: 208 °C unter Zersetzung

<sup>1</sup>H-NMR-Daten in CDCl<sub>3</sub>:

 $\delta$  1,2 (T, 3H, -CH<sub>3</sub>); 1,9 (M, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 2,8 (T, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-); 3,2 - 3,4 (M, 4H, 2 x N-CH<sub>2</sub>-); 3,6 (S, 3H, -CH<sub>3</sub>); 3,8 (S, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 5,8 (S, 1H, =CH-); 6,3 (S, 1H, ArH); 7,4 (S, 1H, ArH)

3. Stufe:

9-Ethyl-4-hydroxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on

20 0,5 g (1,8 mmol) 9-Ethyl-4-methoxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on werden in 5 ml 10 %-iger Salzsäure 2 h zum Rückfluß erhitzt. Die Suspension wird mit 10 %-iger Natriumacetatlösung auf pH 5 abgestumpft. Der Niederschlag wird abgesaugt und im Exsikkator getrocknet.

<sup>1</sup>H-NMR-Daten in d<sub>6</sub>-DMSO:

δ 1,1 (T, 3H, -CH<sub>3</sub>); 1,9 (M, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 2,7 (T, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-); 3,3 - 3,5 (M, 7H, N-CH<sub>3</sub>, 2 x N-CH<sub>2</sub>-); 5,5 (S, 1H, =CH-); 6,3 (S, 1H, ArH); 7,4 (S, 1H, ArH); 10,8 (S, 1H, -OH)

4. Stufe:

4-Chlor-9-ethyl-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on-3-carbaldehyd

Zu 3 ml Dimethylformamid tropft man bei 50 - 55 °C 0.4 g Phosphoroxychlorid. Die Lösung wird noch 1 h bei 50 °C verrührt. Anschließend fügt man bei derselben Temperatur unter Rühren 0,5 g (1,8 mmol) 9-Ethyl-4-methoxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on gelöst in 6 ml Dimethylformamid hinzu. Man rührt noch 5 h bei 80 - 90 °C. Die intensiv gelb gefärbte Lösung wird auf 50 ml Wasser und 10 g Eis ausgetragen und 12 h bei Raumtemperatur verrührt. Der hellgelbe Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet.

Absorptions- und Fluoreszenzmaximum in Ethanol:  $\lambda_A$  = 439 nm;  $\lambda_F$  = 494 nm <sup>1</sup>H-NMR-Daten in CDCl<sub>3</sub>:

 $\delta$  1,3 (T, 3H, -CH<sub>3</sub>); 2,0 (M, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 2,8 (T, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-); 3,5 (M, 4H, 2 x N-CH<sub>2</sub>-); 3,6 (S, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 6,1 (S, 1H, ArH); 7,7 (S, 1H, ArH); 10,4 (S, 1H, -CH=O)

15 5. Stufe:

10

20

JA 210

0,18 g (0,69 mmol) 9-Ethyl-4-hydroxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on und 0,2 g (0,69 mmol) 4-Chlor-9-ethyl-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on-3-carbaldehyd werden in 20 ml Eisessig gelöst und 20 min in einem 100 °C warmen Ölbad erhitzt. Die Lösung wird in 100 ml Wasser gegossen und der Niederschlag abfiltriert. Der Farbstoff wird chromatographisch gereinigt.

<sup>1</sup>H-NMR-Daten in DMSO-d<sub>6</sub>:

25 δ 1,3 (T, 6H, -CH<sub>3</sub>); 1,9 (S, 4H, -CH<sub>2</sub>-); 2,7 (S, 4H, Ar-CH<sub>2</sub>-); 3,4 (S, 6H, N-CH<sub>3</sub>); 3,6 (M, 8H, 2 x N-CH<sub>2</sub>-); 6,2 (S, 2H, ArH); 7,6 (S, 2H, ArH); 8,5 (S, 1H, -CH=)

#### Verbindung JA 227

30

1,2 g (4,5 mmol) 4-(7-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydrochinol-1-yl)-buttersäureethylester und 1,2 g (4,5 mmol) 4-Chlor-7-dimethylamino-1-methyl-

5

15

20

25

chinol-2-on-3-carbaldehyd werden in 50 ml Eisessig gelöst und 5 min in einem 100 °C warmen Ölbad erhitzt. Die Lösung wird in 500 ml 15 %-iger Natriumchloridlösung getropft und der Niederschlag abfiltriert. Der Farbstoff wird chromatographisch gereinigt.

#### B. Farbstoffe mit $R_5$ = (substituierter) Phenyl-Ring

Eine bevorzugte Darstellung der Verbindungen wird exemplarisch anhand der Strukturen 18 (NK 14), 20 (NK 16) und 23 (NK 21) vorgestellt. Die Eduktsynthesen werden, soweit diese nicht literaturbekannt sind, analog zu den in Teil A beschriebenen Beispielen durchgeführt. Die Synthese der Benzoyl-benzoesäure-Derivate erfolgt analog zur literaturbekannten Darstellung des 6-(2-Carboxy-3,4,5,6-tetrachlorbenzoyl)-1-ethyl-7-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolins.

#### Verbindung NK 14

1,2 g (3,9 mmol) 2-(4-Dimethylamino-2-hydroxy)-benzoyl-benzoesäure und 1,0 g (3,9 mmol) 9-Ethyl-4-hydroxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on werden in 40 ml 1,1,2,2-Tetrachlorethan bis zur vollständigen Auflösung der Substanzen zum Rückfluß erhitzt. Nun werden insgesamt 5 g Phosphorpentoxid portionsweise zugegeben und die Reaktionsmischung weitere drei Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wird die Mischung mit je 50 ml Wasser und Chloroform aus dem Kolben gelöst und nach dem Abtrennen der organischen Phase wird die Wasserphase noch dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zur Trockene einrotiert und der Farbstoff anschließend säulenchromatographisch gereinigt.

Die Farbstofffraktionen werden einrotiert, der Rückstand in 50 ml Ethanol

aufgelöst und nach der Zugabe von 10 ml Perchlorsäure (60 %-ig) durch

Zutropfen von Wasser ausgefällt. Nach dem Absaugen wird das Farbstoffperchlorat sorgfältig mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 700 mg

5

10

15

#### Verbindung NK 16

0,75 g (2,22 mmol) 9-(2-Carboxybenzoyl)-8-hydroxy-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-benzo[ij]chinolizin und 0,57 g (2,22 mmol) 9-Ethyl-4-hydroxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on werden in 40 ml 1,1,2,2-Tetrachlorethan bis zur vollständigen Auflösung der Substanzen zum Rückfluß erhitzt. Nun werden insgesamt 5 g Phosphorpentoxid portionsweise zugegeben und die Reaktionsmischung weitere drei Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wird die Mischung mit je 50 ml Wasser und Chloroform aus dem Kolben gelöst und nach dem Abtrennen der organischen Phase wird die Wasserphase noch dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zur Trockene einrotiert und der Farbstoff anschließend säulenchromatographisch gereinigt.

Die Farbstofffraktionen werden einrotiert, der Rückstand in 50 ml Ethanol aufgelöst und nach der Zugabe von 10 ml Perchlorsäure (60 %-ig) durch Zutropfen von Wasser ausgefällt. Nach dem Absaugen wird das Farbstoffperchlorat sorgfältig mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

25 Ausbeute: 160 mg

#### Verbindung NK 21

1,13 g (3,1 mmol) 6-(2-Carboxybenzoyl)-1-ethyl-7-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydro-chinolin und 0,68 g (3,1 mmol) 7-Dimethylamino-4-hydroxy-1-methyl-chinol-2-on werden in 60 ml 1,1,2,2-Tetrachlorethan bis zur

vollständigen Auflösung der Substanzen zum Rückfluß erhitzt. Nun werden insgesamt 4 g Phosphorpentoxid portionsweise zugegeben und die Reaktionsmischung weitere drei Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wird die Mischung mit je 50 ml Wasser und Chloroform aus dem Kolben gelöst und nach dem Abtrennen der organischen Phase wird die Wasserphase noch dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zur Trockene einrotiert und der Farbstoff anschließend säulenchromatographisch gereinigt.

Die Farbstofffraktion wird einrotiert, der Rückstand in 25 ml Ethanol aufgelöst und nach der Zugabe von 8 ml Perchlorsäure (60 %-ig) durch Zutropfen von Wasser ausgefällt. Nach dem Absaugen wird das Farbstoffperchlorat sorgfältig mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 50 mg

15

20

25

#### C. Beispiele zur Konjugatbildung

#### NK 41-Maleinimid

100 mg NK 41 (0.2 mmol) werden in 10 ml getrocknetem DMSO gelöst und mit 100 mg (1 mmol) Maleinsäureanhydrid versetzt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur ca. 24 h verrührt. Man tropft 50 ml einer 10 %igen wäßrigen Natriumperchloratlösung hinzu und filtriert den ausgefallenen Feststoff ab. Der Feststoff wird mit 25 mg Natriumacetat in 5 ml Essigsäureanhydrid suspendiert und für 30 min auf etwa 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen tropft man 30 ml der 10 %igen Natriumperchloratlösung hinzu, filtriert und trocknet den Feststoff.

#### NK 41-Maleinimid-Cystein-Konjugat

70 mg (0.16 mmol) NK 41-Maleinimid wird in 20 ml Ethanol gelöst und portionsweise mit 22 mg (0.16 mmol) Cystein versetzt. Man verrührt bei Raumtemperatur und tropft nach 30 min etwa 50 ml einer 10 %igen Natriumperchloratlösung hinzu. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und getrocknet.

#### 10 NK 27-Aktivester

50 mg (0.1 mmol) NK 27 werden mit 0.2 mmol N-Hydroxysuccinimid und 0.2 mmol Dicyclohexylcarbodiimid in 20 ml Acetonitril gelöst. Man läßt 5 h bei Raumtemperatur rühren und rotiert das Produktgemisch ein. Die Reinigung erfolgt chromatographisch.

#### NK 27-dUTP-Konjugat

15

20

10 mol 5-(3-Aminoallyl)-dUTP werden in 0.5 ml 0.1 M Natriumborat-Puffer (pH 8) gelöst und mit einer Lösung aus 5 mol NK 27-Aktivester in 1 ml aminfreiem Dimethylformamid versetzt. Die Lösung wird 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand chromatographisch gereinigt.

WO 00/64987

5

10

15

20

25

#### **Ansprüche**

Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I

Cyc 
$$R_5$$
  $R_5$   $R_4$   $R_6$   $R_7$   $R_1$   $R_2$   $R_7$   $R_1$ 

als Markierungsgruppen in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten, wobei

Y Sauerstoff oder N-R<sub>8</sub> bedeutet,

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>8</sub> bei jedem Vorkommen unabhängig Wasserstoff, eine Phenyl, eine Phenylalkylgruppe mit 1-3 C-Atomen in der Alkylkette, eine Polyether- oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 C-Atomen, vorzugsweise mit bis zu 6 C-Atomen, bedeuten, die gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy-, Carbonyl-, Alkoxyoder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten kann, oder einer oder mehrere der Reste R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>8</sub> mit einem benachbarten Substituenten ein Ringsystem bilden,

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> und R<sub>7</sub> jeweils unabhängig Wasserstoff, Halogen, Phenyl, eine Hydroxy-, Amino-, Sulfo- oder Carboxygruppe oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 15 C-Atomen bedeuten, wobei die Kohlenwasserstoffgruppen Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Cycloalkyl-, Aryloder/und Heteroarylreste umfassen und gegebenenfalls jeweils einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy-, Aldehyd-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten können,

wobei einer oder mehrere der Reste R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub> und R<sub>7</sub> mit einem benachbarten Substituenten ein Ringsystem bilden können,

Cyc einen organischen Rest bedeutet, der ein Ringsystem, ausgewählt aus aromatischen, hetereoaromatischen, chinoiden oder/und cycloaliphatischen Ringen umfaßt, das gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Amino-, Hydroxy-, Sulfo-, Carboxy-, Aldehyd-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten kann, und

- X gegebenenfalls zum Ladungsausgleich vorhandene Anionen bedeutet.
- 10 2. Verwendung nach Anspruch 1,

#### dadurch gekennzeichnet,

daß die Verbindung I kovalent an einen für den nachzuweisenden Analyten spezifischen Rezeptor gekoppelt wird.

15 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,

#### dadurch gekennzeichnet,

daß das Nachweisverfahren aus Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren und immunchemischen Verfahren ausgewählt wird.

20

25

5

4. Verbindungen der allgemeinen Formel I

Cyc 
$$R_5$$
  $R_4$   $R_6$   $R_7$   $R_1$   $R_2$   $R_7$   $R_1$   $R_2$ 

wobei

Y, R<sub>1</sub>-R<sub>7</sub> und Cyc die in Anspruch 1 angegebenen Bedeutungen besitzen,

X gegebenenfalls zum Ladungsausgleich vorhandene Anionen

bedeutet,

mit der Maßgabe, daß wenn Y Sauerstoff,  $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$  Methyl und  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  und  $R_7$  Wasserstoff sind,

Cyc keine Struktur der Formeln II oder III

5

10

15

aufweist.

- 5. Verbindungen nach Anspruch 4,
- dadurch gekennzeichnet,

daß  $R_1$  mit  $R_7$  oder/und  $R_2$  mit  $R_4$  verbrückt sind und ein Ringsystem, insbesondere einen 5- oder 6-gliedrigen Ring, bilden.

6. Verbindungen der Formel I nach Anspruch 4 oder 5, worin Cyc eine Struktur der Formeln IV, V oder VI

$$R_{10}$$
 $R_{2}$ 
 $R_{11}$ 
 $R_{11}$ 

WO 00/64987 PCT/EP00/03569

31

aufweist, wobei

5

15

 $R_1$ ',  $R_2$ ' und  $R_3$ ' wie  $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$  in Anspruch 1 definiert sind, und  $R_9$ -  $R_{11}$  wie  $R_4$ - $R_7$  in Anspruch 1 definiert sind.

- 7. Verbindungen nach Anspruch 6,
  - dadurch gekennzeichnet,
- daß R<sub>1</sub>' mit R<sub>11</sub> oder/und R<sub>2</sub>' mit R<sub>10</sub> verbrückt sind und ein Ringsystem, insbesondere einen 5- oder 6-gliedrigen Ring bilden.
  - 8. Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 bis 7, die einer der allgemeinen Formeln VIIa-f entsprechen

$$R_2$$
 $R_1$ 
 $R_2$ 
 $R_3$ 
 $R_4$ 
 $R_5$ 
 $R_6$ 
 $R_7$ 
 $R_8$ 
 $R_8$ 
 $R_8$ 
 $R_8$ 
 $R_8$ 
 $R_8$ 
 $R_8$ 

VIIIe 
$$\mathbb{R}$$

$$R_3$$
,  $R_4$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ ,

5 wobei

die gestrichelten Linien gegebenenfalls Doppelbindungen bedeuten und bei Vorhandensein der Doppelbindungen die über eine gestrichelte Linie gebundenen Reste R fehlen,

X, Y,  $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$  wie in Anspruch 4 und 5 definiert sind,

R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>' und R<sub>3</sub>' wie in Anspruch 6 und 7 definiert sind, und R jeweils unabhängig wie R<sub>4</sub> in Anspruch 4 definiert ist.

- Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 bis 8, dadurch gekennzeichnet,
- daß Y Sauerstoff ist.
  - 10. Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 bis 9,
     dadurch gekennzeichnet,
     daß R<sub>5</sub> ein aromatisches, gegebenenfalls substituiertes Ringsystem

5

10

15

umfaßt.

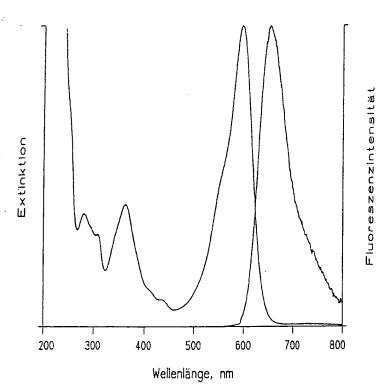
- 11. Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 bis 10,dadurch gekennzeichnet,daß sie eine zur kovalenten Kopplung fähige Gruppe aufweisen.
- 12. Verbindungen nach Anspruch 11,dadurch gekennzeichnet,daß die Kopplungsgruppe -COOH, -NH<sub>2</sub>, -OH oder/und -SH ist.
- 13. Verbindungen nach Anspruch 11 oder 12,,
  dadurch gekennzeichnet,
  daß sie über Kopplungsgruppen an einen Träger oder/und an ein
  Biomolekül gekoppelt sind.
- 14. Verbindungen nach Anspruch 13,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß der Träger ausgewählt ist aus porösem Glas,
   lonenaustauscherharzen, Kunststoffen, Dextranen, Cellulose,
   Cellulosederivaten oder/und hydrophilen Polymeren.
- Verbindungen nach Anspruch 13,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß das Biomolekül ausgewählt ist aus Peptiden, Polypeptiden,
   Nukleotiden, Nukleosiden, Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga oder/und Haptenen.

1 / 3

#### Absorptions- und Fluoreszenzspektren in Ethanol

5

Abbildung 1: JA 227

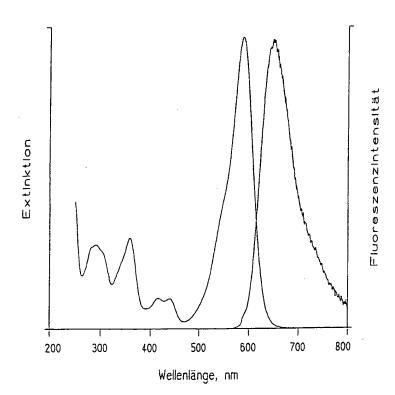


10

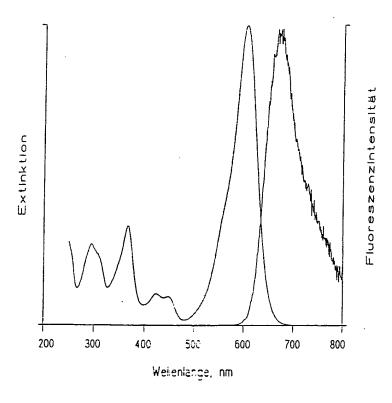
15

. 5 Abbildung 2: NK 13

10



## 5 Abbildung 3: NK 14



#### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

int tional Application No PCT/EP 00/03569

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C09B11/02 C09B C09B11/26 G01N33/533 G01N33/58 CO7H21/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) CO9B GO1N CO7H IPC 7 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) CHEM ABS Data, EPO-Internal C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No. H.HARNISCH: "Über 1-15 Α 4-Chlor-7-dimethylamino-1-methyl-chinolon-(2)-aldehyd-(3), II." LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE. vol. 751, 1971, pages 155-158, XP002145601 VERLAG CHEMIE GMBH. WEINHEIM., DE ISSN: 0170-2041 cited in the application page 155 page 157, paragraph 2 - paragraph 3 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex. Special categories of cited documents: later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance invention earlier document but published on or after the international "X" document of particular relevance; the claimed invention filing date cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the citation or other special reason (as specified) document referring to an oral disclosure, use, exhibition or document is combined with one or more other such docu ments, such combination being obvious to a person skilled other means in the art. document published prior to the international filing date but "&" document member of the same patent family later than the priority date claimed Date of mailing of the international search report Date of the actual completion of the international search 24 August 2000 15/09/2000 Authorized officer Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Ginoux, C Fax: (+31-70) 340-3016

### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int tional Application No PCT/EP 00/03569

		PCI/EP 00/	
C.(Continu	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
A	F.P.SCHÄFER: "Topics in Applied Physics, Vol I, Dye Lasers" 1973 , SPRINGER-VERLAG , BERLIN, HEIDELBERG, NEW YORK XP002145602 006001 cited in the application K.H.Drexhage, Structure and Properties of Laser Dyes; Page 176, Paragraphs 4.8.3. Naphthofluorescein and Related Dyes		1-15
A	EP 0 543 333 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 26 May 1993 (1993-05-26) claims; examples		. 1–15
A	WO 97 36960 A (PERKIN ELMER CORP) 9 October 1997 (1997-10-09) claims 1,17,30,35	·	1–15
		·	

#### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

in itional Application No PCT/EP 00/03569

	atent document d in search repor	1	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP	0543333	Α	26-05-1993	DE	4137934 A	19-05-1993
				AT	137253 T	15-05-1996
				DE	59206119 D	30-05-1996
				DK	567622 T	12-08-1996
				WO	9310189 A	27-05-1993
				EP	0567622 A	03-11-1993
				ES	2087560 T	16-07-1996
		•		JP	9077982 A	2 <b>5-</b> 03-1 <b>997</b>
				JP	9067523 A	11-03-1997
				JP	2634950 B	3 <b>0-</b> 07-1997
				JP	5509131 T	16-12-1993
				US	5750409 A	12-05-1998
WO	9736960	Α	09-10-1997	บร	6020481 A	01-02-2000
	•,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,			AT	181741 T	15-07-1999
				AU	707242 B	08-07-1999
				AU	2432397 A	22-10-1997
				CA	2250014 A	09-10-1997
				DE	69700303 D	05-08-1999
			,	DE	69700303 T	17-02-2000
				EP	0891393 A	20-01-1999
					2000500183 T	11-01-2000
				US	5840999 A	24-11-1998

#### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int tionales Aktenzeichen PCT/EP 00/03569

KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES PK 7 C09B11/02 C09B11/26 G01N33/533 G01N33/58 C07H21/00 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) CO9B GO1N CO7H IPK 7 Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) CHEM ABS Data, EPO-Internal C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Betr. Anapruch Nr. Kategorie\* Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile H.HARNISCH: "Über 1-15 Α 4-Chlor-7-dimethylamino-1-methyl-chinolon-(2)-aldehyd-(3), II.' LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE. Bd. 751, 1971, Seiten 155-158, XP002145601 VERLAG CHEMIE GMBH. WEINHEIM., DE ISSN: 0170-2041 in der Anmeldung erwähnt Seite 155 Seite 157, Absatz 2 - Absatz 3 -/--Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu Siehe Anhang Patentfamilie T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen. "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als beeonders bedeutsam anzusehen ist Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "E" ätteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritäteanspruch zweifelhaft er-scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Aussteltung oder andere Maßnahmen bezieht P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist Datum des Abschlusses der internationalen Recherche Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 15/09/2000 24. August 2000 Bevollmächtigter Bediensteter Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.S. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 Ginoux, C

#### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Irr dionales Aktenzeichen
PCT/EP 00/03569

(ategone*	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN  Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
eroñn ig		
•	F.P.SCHÄFER: "Topics in Applied Physics, Vol I, Dye Lasers" 1973 , SPRINGER-VERLAG , BERLIN, HEIDELBERG, NEW YORK XP002145602 006001 in der Anmeldung erwähnt K.H.Drexhage, Structure and Properties of Laser Dyes; Seite 176, Absatz 4.8.3. Naphthofluorescein and Related Dyes	1-15
i '	EP 0 543 333 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 26. Mai 1993 (1993-05-26) Ansprüche; Beispiele	1-15
<b>.</b>	WO 97 36960 A (PERKIN ELMER CORP) 9. Oktober 1997 (1997-10-09) Ansprüche 1,17,30,35	1-15
		·
		.'
	₹	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP 00/03569

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0543333	Α	26-05-1993	DE 4137934 A	19-05-1993
E1 0310000			AT 137253 T	15-05-1996
			DE 59206119 D	30-05-1996
			DK 567622 T	12-08-1996
			WO 9310189 A	27-05-1993
			EP 0567622 A	03-11 <b>-</b> 1993
			ES 2087560 T	16-07-1996
			JP 9077982 A	25-03-1997
			JP 9067523 A	11-03-1997
			JP 2634950 B	30-07-1997
•			JP 5509131 T	16-12-1993
*			US 5750409 A	12-05-1998
WO 9736960	Α	09-10-1997	US 6020481 A	01-02-2000
	7	05 10 1557	AT 181741 T	15-07-1999
			AU 707242 B	08-07-1999
			AU 2432397 A	22-10-1997
			CA 2250014 A	09-10-1997
			DE 69700303 D	05-08-1999
			DE 69700303 T	17-02-2000
			EP 0891393 A	20-01-1999
			JP 2000500183 T	11-01-2000
			US 5840999 A	24-11-1998